论著

文章编号:1000-5404(2013)01-0038-04

ROCK-I选择性抑制剂 Y-27632 对人 Tenon 囊成纤维细胞增殖、凋亡和黏附性的影响

张晓辉[1],孙乃学[1],冯朝晖[1],王 超[2],张 懿[1],王建明[1] (710004 西安,西安交通大学医学院第二附属医院眼科[1];710032 西安,第四军医大学西京医院药剂科[2])

[摘要] **目的** 观察 ROCK-Ⅰ选择性抑制剂 Y-27632 对体外培养的人眼 Tenon 囊成纤维细胞(ocular Tenon capsule fibroblasts,OTFs)增殖、凋亡和黏附性的影响。**方法** 体外培养的第4~6代 OTFs 经溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid,LPA)诱导后,不同浓度 Y-27632 处理,采用 MTT 测定细胞增殖抑制率和细胞黏附抑制率,未经 LPA 诱导 OTFs 细胞同时采用 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术测定细胞凋亡率,以及细胞平板克隆增殖实验测定不同浓度 Y-27632 组 OTFs 细胞增殖克隆形成率。**结果** 6、30、150、750 μmol/L Y-27632 各组经 LPA 诱导的 OTFs 细胞增殖抑制 $D(490)$ 与 LPA 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),OTFs 细胞黏附抑制 $D(490)$ 与 LPA 组比较,同样具有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$)。随着 Y-27632 浓度增加,细胞凋亡率相应增加。未经 LPA 诱导的 OTFs 细胞克隆形成率随着 Y27632 浓度的增高而降低。**结论** Y-27632 有效抑制 LPA 诱导的 OTFs 增殖和细胞间黏附,诱导细胞早期凋亡。

[关键词] Y-27632;人 Tenon 囊成纤维细胞;增殖;凋亡;黏附性

[中图法分类号] R322.91; R329.25; R988.1 [文献标志码] A

Effect of Y-27632, a selective inhibitor of ROCK-I, on proliferation, apoptosis and adhesion of human ocular Tenon's capsular fibroblasts

Zhang Xiaohui[1], Sun Naixue[1], Feng Zhaohui[1], Wang Chao[2], Zhang Yi[1], Wang Jianming[1] ([1]Department of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710004; [2]Department of Pharmacology, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the effect of Y-27632, a selective inhibitor of ROCK-I, on the proliferation, apoptosis and adhesion of human ocular Tenon's capsular fibroblasts (OTFs) *in vitro*. Methods After induced by lysophosphatidic acid (LPA), the fourth to sixth passages of OTFs were exposed to 6, 30, 150 and 750 μmol/L of Y-27632 for 48 h, respectively, and MTT assay was applied to determine the inhibition ratios of cell proliferation and adhesion. OTFs without LPA induction were treated with different concentrations of Y-27632, and Annexin V-FITC/PI double labeling flow cytometry was applied to determine cell apoptotic rate. The cell cloning efficiency was calculated by cell plate clonal expansion experiment. Results The proliferation inhibition $D(490)$ and adhesion inhibition $D(490)$ of OTFs treated with LPA + Y-27632 were significantly greater than those of LPA-induced OTFs ($P<0.05$, $P<0.01$). Cell apoptotic rate increased along with the increase of Y-27632 concentrations, and the cloning efficiency of OTFs without LPA induction decreased along with the increase of Y-27632 concentrations. Conclusion Y-27632 can effectively inhibit both proliferation and adhesion of LPA-induced OTFs, and induce early apoptosis of OTFs without LPA induction.

[**Key words**] Y-27632; ocular Tenon's capsule fibroblasts; propagation; apoptosis; adhesion

Supported by the Tackling Program of Science and Technology of Shaanxi Province (2011-K14-02-03). Corresponding author: Sun Naixue, E-mail: nxsun_xju@126.com

结膜下 Tenon 囊成纤维细胞是青光眼滤过术后滤过道瘢痕化的主要效应细胞。Rho 小蛋白家族在调节细胞骨架肌球蛋白、细胞点状黏附和细胞运动性起重要作用[1]。Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(Rho-associated coiled-coil kinase,ROCK)被认为是 Rho 蛋白的下游效应因子。在体外培养的成纤维细胞中,ROCK 激酶调节细胞点状黏附,压力纤维的形成[2]。已知细胞的趋化、黏附与收缩都是通过微丝骨架的聚

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2011-K14-02-03)

[通信作者] 孙乃学,E-mail:nxsun_xju@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121101.0923.004.html(2012-11-01)

合与延伸来实现的。Rho/ROCK 信号通路通过多重磷酸化/脱磷酸化级联反应来调节细胞微丝骨架的聚合，控制细胞的多种生物学行为。本研究旨在通过 ROCK-Ⅰ选择性抑制剂 Y-27632 的应用，选择性阻断 Rho/ROCK 信号通路，观察人 Tenon 囊成纤维细胞细胞学行为，包括细胞增殖、凋亡和黏附性的变化。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

DMEM 培养液、胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS）和 0.25% 胰蛋白酶（华美生物工程公司），牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA，美国 Sigma 公司），RPMI1640 培养基（美国 Gibco 公司），噻唑蓝（MTT，美国 Sigma 公司），Y-27632 和溶血磷脂酸（Lysophosphatidic acid，LPA，美国 Sigma 公司），Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒（美国 Invitrogen）。

CX-PC-2 倒置相差显微镜（日本 OLYMPUS），DG3022A 型酶联免疫检测仪（南京华东电子），CO_2 培养箱（美国 Scheldon 公司），超净工作台（苏州净化设备厂），细胞培养板（Coster 公司），流式细胞仪（美国 Beckman Coulter）。全自动细胞平板计数器（美国 Bio-Rad）。

1.2 方法

1.2.1 体外培养细胞　人眼 Tenon 囊组织来源于本院眼科白内障患者术中剪下的 Tenon 囊组织，经由本院伦理委员会批准，并事先征得患者同意。采用组织块贴壁法进行人眼 Tenon 囊成纤维细胞（ocular Tenon capsule fibroblasts，OTFs）培养。剪成 1 mm×1 mm 的组织块，种植于细胞培养瓶内，加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养、传代，倒置相差显微镜下观察细胞生长，取第 4～6 代对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞增殖测定

1.2.2.1 MTT 比色法检测 Y-27632 对 OTFs 细胞增殖的影响　0.25% 胰蛋白酶消化细胞，2% FBS 培养液稀释成 1.5×10^4/mL 单细胞悬液，200 μL/孔接种于 96 孔培养板，即每孔细胞数为 0.3×10^4。

分 7 组（每组 4 个复孔）进行处理：对照组；DMSO 组；LPA（溶血磷脂酸）组；不同浓度 6、30、150 和 750 μmol/L Y-27632 +LPA 组。LPA 浓度均为 10 μmol/L。对照组加入等量 2% FBS + DMEM 培养液；LPA + Y-27632 组：OTFs 添加 10 μmol/L LPA 孵育 24 h，然后添加不同浓度 Y-27632。

7 组细胞孵育 48 h 后，MTT 比色检测。按 20 μL/孔加入 MTT 工作液（5 mg/mL），继续 37 ℃培养。4 h 后弃去孔中液体，按 150 μL/孔加入二甲基亚砜（DMSO），微振荡器振荡 10 min，以 DMSO 为空白对照，酶联免疫检测仪比色测定各孔于 490 nm 波长的光密度值，同时计算不同浓度 Y-27632 处理组的细胞增殖抑制率，细胞增殖抑制率 =［1 - 处理组 D(490)/LPA 组 D(490)］×100%。

1.2.2.2 细胞平板克隆增殖实验　0.25% 胰蛋白酶消化 OTFs 细胞，吹打成单个细胞，细胞计数。1 000/孔细胞接种于 3.5 cm 培养皿，使细胞均匀分散，分别用 0、6、30、150、750 μmol/L Y-27632 处理，37 ℃，5% CO_2 孵箱培养。10 d 后，终止培养，弃上清，PBS 漂洗 2 次，甲醇固定 15 s，弃固定液，结晶紫（0.1% 结晶紫，20% 甲醇溶于双蒸水）染色 30 s，蒸馏水洗去染色液，空气干燥，照相。全自动细胞平板计数器计数。根据各组 OTFs 细胞克隆数，计算克隆形成率（克隆形成率 = 克隆数/接种细胞数 1 000 个×100%）。

1.2.3 细胞凋亡分析（双标记流式细胞术分析 Y-27632 对 OTFs 细胞凋亡的影响）　同上处理 OTFs 细胞，分 5 组，分别加入 0、6、30、150、750 μmol/L Y-27632，孵育 48 h，PBS 洗 2 次，70% 乙醇固定，－20 ℃过夜，加入 100 μL Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin V（20 μg/mL）10 mL，室温避光 30 min，再加入 PI（50 μg/mL）5 mL，避光反应 5 min 后，加入 400 mL Binding Buffer，立即在 FACSort（Beeton Dickson，美国）下行流式细胞术定量检测，同时以不加 Annexin V-FITC 及 PI 的细胞作为阴性对照。

1.2.4 细胞黏附性测定（Y-27632 对 OTFs 细胞黏附的影响）　包被基底膜：10 g/L 的小牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）按 1∶8 稀释 50 mg/L 的 matrigel 胶，50 μL/孔加入 96 孔板，4 ℃过夜。水化基底膜：吸出培养板多余液体，每孔加入 50 μL 含 10 g/L 的 BSA 无血清培养液，37℃孵育 30 min。0.25% 胰蛋白酶消化 OTFs 细胞，调整细胞密度为 10^5/mL，分别将 100 μL 细胞悬液接种于包被的 96 孔板中。分 7 组（每组 4 个复孔）进行处理：空白对照组；DMSO 组；LPA 组；6、30、150 和 750 μmol/L Y-27632 + LPA 组。LPA 浓度均为 10 μmol/L。对照组加入等量 2% FBS + DMEM 培养液，LPA + Y-27632 组：OTFs 添加 10 μmol/L LPA 孵育 24 h，然后添加 Y-27632。72 h 后 OTFs 细胞先后加入 10 g/L 的 BSA 和 1640 培养液，分别在 37 ℃培养 1 h。按 20 μL/孔加入 MTT 工作液（5 mg/mL），继续 37 ℃培养。4 h 后弃去孔中液体，按 150 μL/孔加入 DMSO，微振荡器振荡 10 min，酶联免疫检测仪比色测定各孔于 490 nm 波长的光密度值。以 LPA 组贴壁细胞 D(490) 值为参照，计算细胞贴壁率（细胞黏附率）。黏附抑制率 =［1 - 实验组细胞 D(490) 值/LPA 组细胞 D(490) 值］×100%。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析，各组样本均值方差齐性检验采用 Levene 检验，多组间 D(490) 值比较采用单因素方差分析，各组间两两比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 体外培养细胞

组织块贴壁后 3～7 d 细胞游出组织块，OTFs 细胞贴壁生长，呈梭形，单层漩涡状、放射状排列。20 d 基本长满培养瓶壁，进行传代。传代后细胞 24 h 贴壁，6～10 d 基本融合长满瓶底。传代 4～6 次后，细胞形态保持原状，第 4 代 OTFs 细胞呈扁平长梭形或分枝状单层排列（图 1）。鼠抗人 vimentin 抗体染色鉴定，染色显示细胞质内与细胞长轴方向一致的丝网状、束状纤维（图 2）。

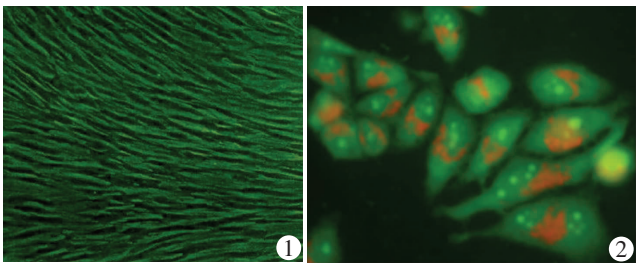


图1 相差显微镜下观察第4代OTFs细胞 （×100）

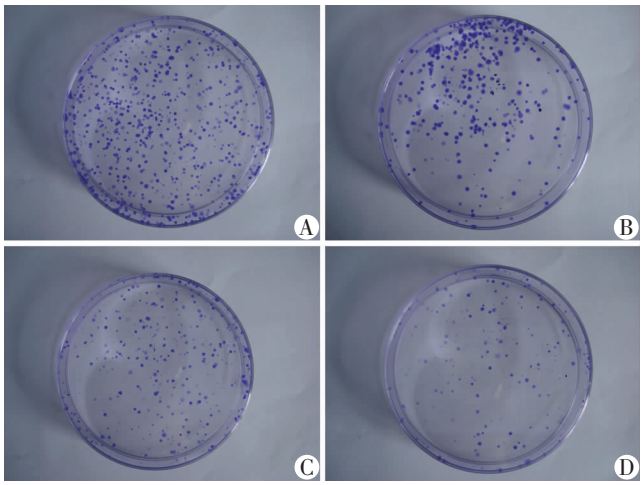
图2 vimentin染色观察OTFs细胞 （×500）

2.2 MTT比色法检测Y-27632对OTFs细胞增殖的影响

方差齐性检验 $P=0.156$，方差齐，可进行下列两两比较。总体样本Levene检验 $P=0.000\ 0$，总体样本具有显著性差异。各组的 $D(490)$ 值之间，对照组（1.278 0±0.040 0）与DMSO组（1.186 0±0.056 0）比较，差异无统计学意义（$P=0.107$）。对照组与Y-27632+LPA 150 μmol/L组（1.148 0±0.076 0）比较，差异有统计学意义（$P=0.026$）。DMSO组与Y-27632+LPA 150 μmol/L组比较，差异无统计学意义（$P=0.488$）。其余各组：LPA组为（2.243 0±0.079 6），Y-27632+LPA 6、30、750 μmol/L组别为（2.082 0±0.050 0）、（1.700 0±0.144 0）、（0.348 0±0.039 7），组间及对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与LPA组比较，Y-27632+LPA 6、30、150、750 μmol/L组OTFs细胞增殖抑制率分别为（7.163 5±1.575 1）%、（23.931 4±8.061 1）%、（48.754 4±4.570 5）%、（84.504 1±1.349 7）%。

2.3 Y-27632对OTFs细胞克隆增殖的影响

0、6、30、150、750 μmol/L Y-27632组OTFs细胞克隆形成率分别是44.8%、35.7%、22.9%、8.2%、0%。OTFs细胞克隆形成率随着Y-27632浓度的增高而降低。见图3。



A：0 μmol/L；B：6 μmol/L；C：30 μmol/L；D：150 μmol/L Y-27632

图3 不同浓度Y-27632对OTFs细胞克隆增殖的影响

2.4 双标记流式细胞术分析Y-27632对OTFs细胞凋亡的影响

凋亡率方差齐性检验 $P=0.053$，方差齐，可进行下列两两比较。Levene检验总体样本 $P=0.036$，总体样本具有显著性差异。Y-27632+LPA 0 μmol/L组与6 μmol/L组比较，差异无统计学意义（$P=0.173$）。Y-27632+LPA 0 μmol/L组与750 μmol/L组比较，差异无统计学意义（$P=0.05$）。Y-27632+LPA 0 μmol/L组分别与30、150 μmol/L组比较，差异有统计学意义（$P=0.028$，0.004）。随着Y-27632浓度增加，凋亡细胞的比例相应增加。但是当Y-27632剂量达到750 μmol/L时，凋亡细胞的比例下降。见表1。

表1 不同浓度Y-27632对HTFS凋亡的影响（$n=3$，%，$\bar{x}\pm s$）

浓度	凋亡细胞	死亡细胞百分比	活细胞百分比
0 μmol/L	0.026 7±0.011 6	0.520 0±0.569 3	99.436 7±0.540 8
6 μmol/L	4.786 7±4.731 0	6.066 7±5.452 3	89.143 3±2.135 0
30 μmol/L	8.336 0±3.738 2[a]	10.013 3±6.176 7	81.533 3±7.214 5[b]
150 μmol/L	12.310 0±6.479 0[b]	36.556 7±12.159 0[b]	50.423 3±8.046 0[b]
750 μmol/L	7.246 7±0.808 5[a]	55.026 7±8.827 8[b]	37.306 7±8.827 8[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与0 μmol/L比较

2.5 Y-27632对OTFs细胞黏附的影响

方差齐性检验 $P=0.400$，方差齐，可进行下列两两比较。总体样本Levene检验 $P=0.000$，总体样本具有显著性差异。各组的 $D(490)$ 值之间，对照组（0.289 0±0.045 1）与LPA组（0.333 7±0.047 5）比较，差异无统计学意义（$P=0.158$）。对照组与Y-27632+LPA 6 μmol/L组（0.256 7±0.024 7）比较，差异无统计学意义（$P=0.303$）。DMSO组（0.220 5±0.060 9）与Y-27632+LPA 6 μmol/L组比较，差异无统计学意义（$P=0.249$）。DMSO组与Y-27632+LPA 30 μmol/L组（0.211 6±0.024 3）比较，差异无统计学意义（$P=0.772$）。Y-27632+LPA 6 μmol/L与30 μmol/L组比较，差异无统计学意义（$P=0.154$）。Y-27632+LPA 150 μmol/L（0.103 3±0.060 6）与750 μmol/L组（0.041 3±0.013 8）比较，差异无统计学意义（$P=0.055$）。其余各组间比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与LPA组比较，Y-27632+LPA 6、30、150、750 μmol/L组OTFs细胞黏附抑制率分别为（22.59±6.60）%、（41.39±8.31）%、（69.16±19.21）%、（87.66±3.82）%。

3 讨论

青光眼术后滤过道瘢痕化是青光眼手术降眼压失败的主要原因之一。目前有研究表明滤过泡部位的结膜下瘢痕形成受OTFs细胞增生、迁移和收缩的影响[3]。青光眼手术后抗代谢药物的使用导致术后多个与滤过泡相关的并发症[4]。因此，我们需要不会造成广泛的组织损伤的抗瘢痕药物。在本研究中，一种特异性ROCK抑制剂Y-27632，在没有明显的细胞毒性时，可以诱导体外培养的OTFs发生多项变化，同时抑制OTFs增殖。

在增殖实验中，Y-27632可以抑制LPA诱导的OTFs增殖，并且随着Y-27632浓度的增加，对OTFs细胞增殖抑制率逐渐增强。以LPA组为对照，Y-27632+LPA 6、30、150、750 μmol/L各组OTFs细胞增殖抑制实验中 $D(490)$ 与LPA组比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$，$P<0.01$），同时4组处理组组内两两比较，差异均有统计学意义（$P=0.000$）。LPA存在于房水

中,在青光眼滤过术术中和术后,由于血-房水屏障的破坏和循环流动的房水浸泡滤过道伤口,所以 OTFs 一直暴露在房水,血清中的 LPA 和 TGF-β 中[8]。LPA 主要通过 Rho/ROCK 信号通路调控黏着斑激酶的酪氨酸磷酸化和肌动蛋白细胞骨架的重组[5],诱导剧烈的肌动蛋白纤维收缩和细胞的点状黏附,是强效的 OTFs 刺激因子之一[6-7]。根据报道,Y-27632 可以抑制胶原格点模式中 LPA 诱导的肌纤维母细胞的收缩,提示我们细胞的收缩有赖于 Rho 小蛋白的活化[9]。在细胞平板克隆增殖实验中,未经 LPA 诱导的 OTFs 细胞克隆数和细胞克隆形成率均随着 Y27632 浓度的增高而降低,二者成负相关关系。与 0 μmol/L Y-27632 处理组相比,提高药物浓度对克隆形成还是相当有影响的,同时 750 μmol/L 浓度 OTFs 细胞克隆数为 0,说明药物本身具有一定的毒性,组间差异较 MTT 实验大,可能是由于无 LPA 的作用。因此,对于无论有无 LPA 诱导的 OTFs 细胞,Y-27632 都具有明显的抑制作用。

在 Y-27632 对未经 LPA 诱导的 OTFs 细胞凋亡实验中,随着 Y-27632 浓度增加,凋亡细胞的比例也相应增加,两者具有正相关性。但是 Y-27632 浓度增加后,坏死细胞的比例上升更快,当 Y-27632 浓度达到 750 μmol/L 时,坏死细胞过多造成凋亡细胞的比例下降。实验表明 Y-27632 可以诱导 OTFs 细胞的凋亡,使其活力下降,Y-27632 浓度达到 750 μmol/L 时,开始出现细胞毒性。Rho 小蛋白家族是细胞骨架肌动蛋白的重要调节因子,Rho/ROCK 信号转导参与众多与细胞骨架有关的细胞变化。有研究报道[11],ROCK 特异性抑制剂 Y-27632 在多种细胞类型中,如上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞和神经细胞,能抑制细胞周期从 G_1 期向 S 期过渡。

在黏附性实验中,Y-27632 可明显抑制 LPA 诱导的 OTFs 细胞之间的黏附性,并且随着 Y-27632 浓度的增高,OTFs 细胞黏附抑制率增强。同样以 LPA 组为对照,Y-27632 + LPA 6、30、150、750 μmol/L 4 组 OTFs 细胞黏附抑制率分别为 123.074 6%、136.589 8%、169.044 1%、187.623 6%。Y-27632 浓度与 OTFs 细胞黏附抑制率表现出线性正相关关系。4 组 OTFs 细胞黏附抑制实验中 $D(490)$ 与 LPA 组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。然而有实验表明 Y-27632 可增加 OTFs 和小梁网细胞细胞对细胞外基质的黏附性[10]。众所周知,细胞骨架蛋白与整合素相互作用,调节细胞形状和细胞对细胞外基质的黏附性。因此,这种细胞之间的黏附性的下降和细胞对细胞外基质的黏附性的增加,可能与细胞形状的改变和细胞周边的点状黏附的再分布有关。上述实验提示 Y-27632 由于有效抑制 LPA 诱导的 OTFs 增殖和 OTFs 细胞间的黏附而可能成为一种强效抗瘢痕药物。

本实验 Y-27632 作为一种选择性 ROCK 抑制剂,有效抑制 LPA 诱导的 OTFs 增殖和 OTFs 细胞间的黏附,同时诱导 OTFs 细胞的早期凋亡,使其活力下降,并且明显抑制未经 LPA 诱导的 OTFs 克隆增殖,并且没有明显细胞毒性。本研究从 OTFs 瘢痕化的角度出发,探讨了 Y-27632 对 OTFs 细胞增殖、黏附和凋亡的影响,同时为阐明 Rho/ROCK 信号转导在 OTFs 瘢痕化中的作用和发展一种新型抗瘢痕药物提供思路。

参考文献:

[1] Kim S, Lee Y, Seo J E, *et al*. Caveolin-1 increases basal and TGF-beta1-induced expression of type I procollagen through PI-3 kinase/Akt/mTOR pathway in human dermal fibroblasts[J]. Cell Signal, 2008, 20(7): 1313-1319.

[2] Colwell A S, Faudoa R, Krummel T M, *et al*. Transforming growth factor-beta, Smad, and collagen expression patterns in fetal and adult keratinocytes[J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(3): 852-857.

[3] Meyer-ter-Vehn T, Sieprath S, Katzenberger B, *et al*. Contractility as a prerequisite for TGF-beta-induced myofibroblast transdifferentiation in human tenon fibroblasts[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006, 47(11): 4895-4904.

[4] Yoon P S, Singh K. Update on antifibrotic use in glaucoma surgery, including use in trabeculectomy and glaucoma drainage implants and combined cataract and glaucoma surgery[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2004, 15(2): 141-146.

[5] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(22): 3056-3062.

[6] Anand N, Arora S, Clowes M. Mitomycin C augmented glaucoma surgery: evolution of filtering bleb avascularity, transconjunctival oozing, and leaks[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90(2): 175-180.

[7] Mead A L, Wong T T, Cordeiro M F, *et al*. Evaluation of anti-TGF-beta2 antibody as a new postoperative anti-scarring agent in glaucoma surgery[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(8): 3394-3401.

[8] Yin Z, Watsky M A. Chloride channel activity in human lung fibroblasts and myofibroblasts[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(6): L1110-L1116.

[9] Fu X D, Flamini M, Sanchez A M, *et al*. Progestogens regulate endothelial actin cytoskeleton and cell movement *via* the actin-binding protein moesin[J]. Mol Hum Reprod, 2008, 14(4): 225-234.

[10] Tomasek J J, Vaughan M B, Kropp B P, *et al*. Contraction of myofibroblasts in granulation tissue is dependent on Rho/Rho kinase/myosin light chain phosphatase activity[J]. Wound Repair Regen, 2006, 14(3): 313-320.

[11] Breslin J W, Yuan S Y. Involvement of RhoA and Rho kinase in neutrophil-stimulated endothelial hyperpermeability[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(3): H1057-H1062.

(**收稿**:2012-08-20;**修回**:2012-10-14)

(编辑 张 维)